

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-204799

(P2003-204799A)

(43)公開日 平成15年7月22日 (2003.7.22)

(51)Int.Cl.⁷

C 12 P 19/34
C 12 N 15/09

識別記号

F I

C 12 P 19/34
C 12 N 15/00

テマコト^{*}(参考)

Z 4 B 0 2 4
A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2002-4913(P2002-4913)

(22)出願日 平成14年1月11日 (2002.1.11)

(71)出願人 000004178

ジェイエスアール株式会社
東京都中央区築地五丁目6番10号

(72)発明者 范 可君

東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ
エスアール株式会社内

(72)発明者 比嘉 郁乃

東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ
エスアール株式会社内

(74)代理人 100081994

弁理士 鈴木 俊一郎 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 白血球含有試料からの核酸分離方法

(57)【要約】

【課題】白血球を含む試料から、核酸 (DNA、RNAなど) を短時間、簡便、低成本で核酸を抽出し高純度、大量に精製する方法ならびに当該方法を実施するキットを提供すること。

【解決手段】本発明による方法は、

- 1)白血球含有試料と、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液とを接触させる工程、
- 2)次いで水溶性有機溶媒の存在下、該白血球含有試料と、ストークス直徑が0.01~50mmであって最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005~100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体とを接触させて、該試料中の核酸を該固相担体表面に吸着させる工程、ならびに
- 3)次いで該固相担体を洗浄し、必要に応じてさらに核酸を溶離する工程

からなることを特徴としている。

(2)

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】白血球含有試料から核酸を分離する方法であって、

- 1) 白血球含有試料と、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液とを接触させる工程、
- 2) 次いで水溶性有機溶媒の存在下、該白血球含有試料と、ストークス直径が0.01～50mmであって最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体とを接触させて、該試料中の核酸を該固相担体表面に吸着させる工程、ならびに
- 3) 該固相担体を洗浄し、必要に応じてさらに核酸を溶離する工程からなる核酸分離方法。

【請求項2】前記細胞分解酵素が、アミラーゼ、リバーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼよりなる群から選択される、少なくとも1つ以上の酵素を含むことを特徴とする請求項1に記載の核酸分離方法。

【請求項3】前記水溶性有機溶媒は、ブタノール、2-ブタノール、ペンタノール、2-ペンタノール、メタノール、エタノール、プロパンノール、イソプロパンノールよりなる群より選択される、少なくとも1つ以上の有機溶媒を含むことを特徴とする請求項1に記載の核酸分離方法。

【請求項4】前記固相担体の表面は、合成高分子、無機物質、ガラスよりなる群から選択されるものからなることを特徴とする請求項1に記載の核酸分離方法。

【請求項5】白血球含有試料から核酸を分離する手段として、少なくとも

- (a) 白血球含有試料と接触させる、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液、
- (b) ストークス直径が0.01～50mmであって、最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体、
- (c) 水溶性有機溶媒、
- (d) 該固相担体を洗浄するための洗浄液、および所望により該固相担体に吸着された核酸を回収するための溶離液、

とからなることを特徴とする核酸分離用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の技術分野】本発明は、核酸を含む試料から、核酸を分離する方法およびその方法の実施に用いられるキットに関する。さらに詳しくは、白血球などを含有する試料から酵素処理、固相担体への吸着により核酸を抽出分離して精製する方法およびその方法を実施するためのキットに関する。

【0002】

【発明の技術的背景】近年、核酸分析の用途は、科学研究、医療、産業界など様々な分野に広がりつつあり、多様な試料から効率的かつ好収率に核酸を抽出、精製できる方法が求められている。核酸を含有する試料から核酸

を得る方法としてはフェノール・クロロホルム抽出法が古くから利用してきた。この方法はフェノール・クロロホルムを用いてタンパク質、脂質などの水難溶性の検体成分を変性、溶解または沈殿させる一方、核酸を水相に溶解するという溶解度の違いを利用する。かかる有毒な溶媒を使用しない代替方法として、カオトロピック溶液を利用してタンパク質、脂質等の夾雑物を水相に可溶化し、核酸をシリカビーズに吸着させて固相で回収後、核酸を再び水相に溶解するBoom法 (Boom et al. J. Clin. Microbiol. 28:495-503 (1990)) などがある。しかし、それらの方法では、抽出された核酸をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の鑄型として使用するか、または制限酵素で消化する場合には、核酸溶液に残存するフェノール、クロロホルム、カオトロピックイオンにより酵素反応が阻害されることがある。これを回避しようとエタノール沈殿、限外ろ過、カラムクロマトグラフィーなどにより核酸を再度精製する操作を施す必要があつて煩雑を極める。また有毒なフェノール、クロロホルムを用いることによる使用場所、実験設備の制限があり、加えて複数回の遠心分離操作があるため、機械化による対応、すなわち自動処理化も事実上困難である。

【0003】また、カオトロピック溶液とシリカ担体を使用する方法では、処理できる検体量が1ml未満であり、検体容量が増えると回収される核酸純度が著しく低下する傾向にある。このことは、使用するシリカ担体の吸着能に起因するものである。シリカ担体の使用量を増やせば、固液分離におけるカオトロピック塩の残存量も使用担体量に比例したデッドボリュームにより増えることとなる。これには洗浄回数を増やすことによって対処できるが、結果的には操作時間の増大、操作工程の複雑化となるため有効な解決策とはならない。

【0004】一方、核酸含有溶液をエタノール溶液で沈殿し、ガラス棒で巻き取る方法も古くから知られている (たとえば、阿南功一編「基礎生化学実験法2」丸善、1974)。この手法はガラスと核酸との親和性に基づく側面もあるが、核酸沈殿物のガラス棒への物理的または幾何学的な絡み合いの要素が強い。なぜならば核酸の沈殿量が少ないか、または沈殿するほどの核酸量がない場合には、同じエタノール溶液に沈殿があつてもガラス棒による核酸の巻き取りはできないからである。この方法は、核酸以外の高分子の混入も見られ回収核酸の純度が低くなることもあるが、実用的な応用は限られている。

【0005】このように、生物起源の様々な核酸含有試料から、有毒溶媒または腐食性試薬を使用することなく、簡便かつ迅速に核酸を高純度に抽出精製でき、しかも自動化の途も開けている方法が切望されている。このような事情に鑑み、本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、試料中の核酸を、表面に適切な凹凸を有する水不溶性の固相担体に吸着させることにより上記問題点を解決することができることを見出し、本発明を完成するに至

(3)

3

った。本発明による方法に基づいて、血液検体から核酸を高純度に分離する操作を自動処理化することも可能となる。

【0006】

【発明の目的】本発明は、従来のフェノール、クロロホルムのような有毒溶媒を使用せず、また、カオトロピック物質のような腐食性試薬も使用せず、酵素処理で核酸以外の生体高分子を低分子化することで核酸のみを抽出して迅速、簡便に分離する新しい方法であって、核酸を白血球含有試料から大量に抽出し高純度に精製でき、かつ自動化できる方法およびそのための手段を提供することを目的とする。

【0007】

【発明の概要】本発明は、白血球含有試料から核酸を分離する方法であって、

- 1) 白血球含有試料と、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液とを接触させる工程、
- 2) 次いで水溶性有機溶媒の存在下、該白血球含有試料と、ストークス直径が0.01～50mmであって最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体とを接触させて、該試料中の核酸を該固相担体表面に吸着させる工程、ならびに
- 3) 該固相担体を洗浄し、必要に応じてさらに核酸を溶離する工程からなる核酸分離方法である。

【0008】上記核酸分離方法において、細胞分解酵素は、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼよりなる群から選択される、少なくとも1つ以上の酵素を含むことを特徴としている。また前記水溶性有機溶媒は、ブタノール、2-ブタノール、ペンタノール、2-ペンタノール、メタノール、エタノール、プロパンノール、イソプロパンノールよりなる群より選択される、少なくとも1つ以上の有機溶媒を含むことを特徴としている。

【0009】さらに前記固相担体の表面は合成高分子、無機物質、ガラスよりなる群から選択されるものからなることを特徴としている。さらに本発明による核酸分離用キットは、上記方法を実施するためのもので白血球含有試料から核酸を分離する手段として、少なくとも(a)白血球含有試料と接触させる、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液、(b)ストークス直径が0.01～50mmであって、最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体、(c)水溶性有機溶媒、(d)該固相担体を洗浄するための洗浄液、および所望により該固相担体に吸着された核酸を回収するための溶離液、とからなることを特徴としている。

【0010】

【発明の具体的説明】本発明による核酸分離方法は、白血球含有試料から核酸を分離する方法であって、

- 1) 白血球含有試料と、少なくとも細胞分解酵素および界

4

面活性剤を含むライシス溶液とを接触させる工程、
2) 次いで水溶性有機溶媒の存在下、該白血球含有試料と、ストークス直径が0.01～50mmであって最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体とを接触させて、該試料中の核酸を該固相担体表面に吸着させる工程、ならびに
3) 次いで該固相担体を洗浄し、必要に応じてさらに核酸を溶離する工程からなることを特徴としている。

【0011】以下、本方法を、実施するための手段とともに説明する。なお、本明細書において「核酸」とは、二本鎖(ds)核酸、一本鎖(ss)核酸、またはその組み合わせ(部分的なdsまたはss)としてのDNA、RNA、cDNAなどを意味する。

・対象

本発明の方法が適用される対象は、白血球を含有する試料であれば特に限定されない。具体的には血液または細胞培養液などである。

【0012】血液は、通常の末梢血、動脈血、静脈血またはこれらに遠心処理等を施してから採取した有形成分、バフィコート(血液の炎症性痴皮、白血球フラクション)であってもよい。全血、血液の有形成分を対象とする場合、以下に示す溶血操作、続いて白血球分離操作の工程が必要となる。本発明において採血管の種類には特にこだわるものではなく、ヘパリン採血管、EDTA採血管、クエン酸採血管などのいずれを使用してもよい。さらに本発明において処理できる血液量に関しては特に限定する要因はなく、数μL～数百Lと極めて広範囲の血液量に対応することができる。

【0013】なお、細胞溶解、核酸吸着(および溶出)の操作において、温度および時間などは、無用な副反応、白血球または核酸の傷害を防止する観点から所定の条件に従うことが望ましい。

・溶血および白血球分離の工程

血液の核酸量は、主に白血球細胞中の核酸により決定される。このため溶血操作は、核を有しないが血液中に多量に存在する赤血球を破壊することにより(すなわち、溶血を起こし)、その後の遠心分離による白血球の分離を容易にする目的のもとに行われる。溶血方法は特に限定されず、たとえば攪拌、通常の室温または低温の溶血なども可能であるが、溶血剤を血液試料に作用させることによる方法が好ましい。公知の溶血剤には、塩化アンモニウム、シュウ酸アンモニウム、サポニンなどが挙げられる。このうちで温和な条件で著しい溶血効果を発揮する溶血剤として、少なくとも0.01～0.5M塩化アンモニウムを含むものが好適である。さらに必要に応じてトリス緩衝液、リン酸緩衝液のようなpHをコントロールするための緩衝液、浸透圧を調節するための塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの塩、白血球の破壊を防止するためのマグネシウム塩、DNA分解を阻止するためのEDTAなどのキレート剤あるいはサッカロースなどの糖

(4)

5

類などを添加してもよい。なお、緩衝液を併用する場合、その濃度は数mMから数百mMの範囲で適宜選択できる。

【0014】上記溶血剤は、通常、血液検体（全血の場合は、遠心分離により血球と血漿もしくは血清とを分離しておく）1容量に対して好ましくは0.1～30倍容量分、より好ましくは2～10倍容量分を加える。0.1容量未満の使用量では、溶血効果が希薄となるため実効性に乏しい。逆に30倍容量を超えると、操作容量が大量となり遠心分離操作の効率も含め、全体の処理効率は著しく低下する。効果的な赤血球の溶解のために、30～85°C、好ましくは40～70°Cに加温してある0.01～0.5M塩化アンモニウムを含む溶血剤を使用することが望ましい。30°C未満では、溶血効果が低く、85°Cを超える加温では、血液中の変性タンパク質量が急増し、遠心分離の際に目的の白血球とともに沈殿してくるため白血球の純度が低下する傾向が顕著となる。上記の条件で溶血操作を行うと赤血球のみを完全に破壊し、白血球が損傷を受けることなく回収できる。

【0015】溶血した上記試料から白血球を分離するには、通常使用されている遠心分離が好適である。回転数、時間、温度などの遠心分離の条件は、試料の状態などに応じて適宜選択すればよい。

・細胞溶解の工程

白血球の溶解操作は、細胞膜、核膜、タンパク質などを分解して、細胞核内から溶解液中へ核酸を遊離させるために公知の方法を用いることができる。そのための方法として、たとえば浸透圧、ずり応力、凍結破碎、摩碎剤による機械的な力などを利用する細胞膜の破壊方法、物理的なエネルギーを利用する超音波法、各種の界面活性剤、変性剤もしくは酵素類を利用する化学的方法あるいはこれらを組み合わせた方式などが挙げられる。

【0016】本発明の方法において好ましい操作は、分離した白血球から目的の核酸を含む細胞内容物を得るために、白血球を酵素消化するものである。その酵素消化は、白血球を含む試料に次のライシス溶液を加えて行う。

ライシス溶液

細胞溶解用溶液、すなわちライシス (lysis solution) 溶液に、少なくとも細胞分解酵素を0.1～50 mg/ml 含むことが必要である。本発明にいう細胞分解酵素とは、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼよりなる群から選択される少なくとも1つ以上の酵素である。

【0017】アミラーゼは、デンプンを加水分解する酵素の総称であり、酵素分類法に従って3.2に属するグリコシル化合物を分解する酵素である。具体的には、 α アミラーゼ、 β アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼなどが例示される。これらは、単独であるいは組み合わせて使用してもよい。リパーゼは酵素分類法に従つ

(4)

6

て3.1に属するエステル分解酵素である。

【0018】プロテアーゼは酵素分類法に従って3.4に属し、ペプチド結合を特異的に加水分解する酵素の総称であり、通常プロティナーゼ、ペプチドヒドロナーゼ、ペプチダーゼ、プロナーゼなどがある。このようなタンパク質分解酵素を含めることにより、核酸とタンパク質との分離度を上げることができる。プロテアーゼの具体例として、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロテアーゼK、プロナーゼ、パパインおよびこれらの類似型、サブ系などが挙げられる。これらは、単独あるいは組み合わせて使用してもよい。

【0019】ヌクレアーゼは酵素分類法に従って3.1に分類され、DNA、RNAのポリヌクレオチド鎖を加水分解する酵素群の総称である。本発明による方法では、DNAおよびRNAのいずれも抽出することができる。回収する核酸がDNAの場合、RNAヌクレアーゼを使用し、RNAを回収する場合にはDNAヌクレアーゼを使用すれば、これらの核酸の抽出分離が促進される。

【0020】これらの細胞分解酵素は生物体から抽出したものであってもよいし、遺伝子組み換え技術により調製される酵素であってもよい。また、これらの多くの酵素は、市場入手が可能である。上記ライシス溶液に使用する界面活性剤として、アニオン、カチオン、ノニオン性界面活性剤などが挙げられる。これらのうち白血球膜の破壊効率および後続の酵素反応効率を促進する観点から、アニオン性界面活性剤を用いることが望ましい。具体的には、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、高級アルコール硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸アンモニウムなどが好ましい。これらは、単独あるいは組み合わせて使用してもよい。ライシス溶液における界面活性剤濃度は、好ましくは、0.01～15% (w/v) 、より好ましくは0.25～10% (w/v) である。

【0021】さらに必要に応じてトリス緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液のようなpHをコントロールするための緩衝液 (pH 5～9) 、塩化ナトリウム、塩化カリウム塩化リチウム、酢酸ナトリウムなどの塩などを添加してもよい。なお、緩衝液を併用する場合、その濃度は数mMから数百mMの範囲で適宜選択できる。

酵素消化による細胞の溶解操作

本発明において、前記の複数種類の酵素をライシス溶液に共存させ、同時に添加して白血球を処理してもよく、あるいは前後に順序をつけて酵素を添加して処理してもよい。複数の酵素を使用するとき、それぞれの酵素濃度を0.05～50mg/ml、好ましくは0.5～10mg/mlの範囲で調整することが好ましい。これらの酵素を使用する際、酵素活性を最大に引き上げるために使用する酵素の種類に応じて、緩衝液、塩、イオン種、界面活性剤などを適宜調整することはいうまでもない。

【0022】本発明において、酵素処理の条件は、35～

(5)

7

85°C、好ましくは40~60°Cで0.1~10時間攪拌しながら加温すればよい。特に白血球の多い検体に対しては、反応系の粘度を低下させるため、より強い攪拌が好ましい。酵素処理の温度は35°C未満になると処理時間が従に長くなるため不都合である。85°Cを超えると酵素自体の変性が起こりやすくなるため好ましくない。

・固相担体への吸着工程

通常は、上記細胞溶解処理を終えた細胞内容物を含む試料から核酸を、以下に開示する特別な固相担体を含む水溶性有機溶媒を含有する溶液に接触させることにより該固相担体に吸着させて他の高分子夾雜物と分離する。

固相担体

本発明において、目的とする核酸を吸着させるために使用される固相担体は、表面に凹凸を有する非多孔質、水不溶性の担体である。

【0023】上記水不溶性固相担体を形成する材料は水に不溶であればよい。ここでいう水不溶性とは、具体的に水、他のいかなる水可溶性組成を含む水溶液に溶解しない固相を意味する。具体的に無機化合物、金属、金属酸化物、有機化合物またはこれらを組み合わせた複合材料を含む。具体的に固相担体として使用される材料は、特に限定されるものではないが、一般にポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレン、ポリアミドなどのような合成有機高分子、ガラス、シリカ、二酸化珪素、窒化珪素、酸化ジルコニア、酸化アルミニウム、酸化ナトリウム、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化亜鉛などの無機物またはステンレス、ジルコニアなどの金属であってもよい。これらの中から有機ポリマー、特にポリスチレンが好ましい。

【0024】本発明に使用される固相担体の表面を構成する材料の組成は特に限定されるものではないが、上記の材料が例示される。前記固相担体の表面は、特に合成高分子、無機物質、ガラスよりなる群から選択されるものからなることが好ましい。本発明の固相担体の特徴は、その表面における微視的な形状にある。具体的には固相担体表面に適切な凹凸が存在することであり、このような凹凸の存在により、固相担体と目的の核酸との相互作用が有効に起こり、またその表面積が増える利点もある。この凹凸は均一的であることは特に要求されない。すなわち一般的に成形加工などの製造プロセスの中で形成されるものであってもよいし、凹凸を得るために表面研磨を施すことにより付与したものであってもよい。

【0025】上記固相担体の表面凹凸をさらに詳細に説明すると、固相担体の凹凸が最大高さ法で表した場合の表面粗さで0.005~100μm、より好ましくは0.01~10μmであることが望ましい。表面凹凸がこのようなミクロンオーダーの範囲にあれば、核酸の初期析出物のサイズに適合する場合が多い。その結果、核酸分子と上記固相担

8

体とのミクロ的な接触相互作用が著しく促進されることとなり、効率的な核酸抽出が実現される。上記表面凹凸が0.005μm未満になると、担体表面が滑らかになりすぎて核酸分子が結合しにくいため好ましくない。また凹凸が100μmを超えると、ミクロ的に見れば、滑らかな局所が多くなるために同様の理由から本発明に使用することは必ずしも好ましいとはいえない。結局、本発明の方法の条件において、水溶性有機溶媒中にある核酸と核酸以外の成分との析出速度の違い、析出物の形成速度の違いを効果的に利用し、核酸の初期析出物を上記固相担体表面に有効に吸着させ、他成分との効率的な分離を可能としている。

【0026】本発明における固相担体についての表面粗さの計測値である最大高さとは、JIS規格(B0601)で定義されている表面粗さの表現方法である。具体的には、触針法で固相担体表面の粗さを測定し、得られた凹凸表面曲線の一部基準長さを選択し、その部分の最大凹凸部を含むように平行な2直線を引き、この2直線の間隔を最大高さの値とするものである。表面粗さの測定には、たとえば膜厚計を使用することができる。

【0027】本発明の固相担体は、使用する素材により表面凹凸レベルの調整方法は異なってくる。無機材料、たとえばガラスの場合には曇りガラスの製造法であるフッ酸処理をそのまま転用することができる。有機ポリマー素材の場合、成形されたポリマーをサンドペーパーで研磨する方法、または研磨機にかける方法などを利用できる。

【0028】本発明の固相担体の形状は特に限定されるものではない。その形状として粒子、チューブ、プレート、管、容器などが挙げられるが、通常は粒子であることが望ましい。粒子の形状としては、たとえば球形、楕円体形、錐体、立方形、直方体形などが考えられる。このうち球形粒子の担体は製造がしやすく、使用時に、固相担体の回転攪拌がしやすいため好ましい。このような球状担体について、そのストークス直径は0.01~50mmの範囲であることが好ましく、0.1~10mmの範囲であることがより好ましい。該直径が0.01mm未満になると、重力による粒子回収に時間がかかることおよび再分散するときの粒子衝突が強すぎて核酸鎖を物理的に切断して細分化を招く。また該直径が50mmを超えると、通常数mlの血液検体からの核酸抽出に占める容積が大き過ぎて、操作しづらくなる。とりわけ現行機器での対応による自動化の場合には、ハンドリングがその障害となることがある。なお、本発明にいう「ストークス直径」とは、固相担体が粒子の場合の有効径であり、球状以外の形状を有する固相担体のサイズは、ストークス法則に従って求められた直径を、同一ストークス直径を有する球状担体の直径とみなすことができる。

【0029】上記固相担体は、その表面も含めた担体全体が同一の材料から構成されている場合のほかに、必要

(6)

9

に応じて複数の素材から構成されるハイブリット体であつてもよい。この場合でも固相担体の表面を構成する素材は合成高分子、無機物質、ガラスよりなる群から選択されるものであり、その表面の凹凸が最大高さ法で表した場合の表面粗さで0.005~100μm、より好ましくは0.01~10μmであることが望ましい。より具体的には、自動化機器に対応することができるために、コア部分は酸化鉄、または酸化クロムのような磁気応答性材料で作られ、その表面を有機合成ポリマーで被覆された複合ボール形状のものが挙げられる。このような磁気応答性ボールの球状担体は、ロボットを使用して操作するときに特に有利である。

水溶性有機溶媒

本発明に使用する水溶性有機溶媒として、アルコール基を含む水に可溶な溶媒が挙げられ、特にアルコールが好ましい。具体的には、そのアルコールとして、ブタノール、2-ブタノール、ペンタノール、2-ペンタノール、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールよりなる群より少なくとも1つ以上選択される。水溶性有機溶媒は1種の溶媒を単独で使用してもよいし2種以上を併用してもよい。これらのうちで、特にエタノール、イソプロパノールが好ましい。

【0030】これらの水溶性有機溶媒を用い場合の核酸抽出時のその最終濃度は、25~100容量%、好ましくは40~100容量%である。通常細胞や宿主から遊離された核酸は上記有機溶媒の濃度で、核酸のみが固相担体表面に析出、吸着される。必要に応じて上記水溶性有機溶媒に塩、界面活性剤を添加してもよい。たとえばナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩またはデシルスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。添加する塩の該溶媒液での最終濃度は、好ましくは0.1~50mM、さらに好ましくは0.5~10mMである。塩濃度が0.1mM未満では添加する塩による核酸析出効果が小さいため好ましくない。逆に50mMを超える塩濃度では、核酸以外の親水性タンパク質などの析出も引き起こすようになるため、核酸のみの塩析効果が減殺される。同様に界面活性剤の該溶媒液での最終濃度は、0.01~15% (w/v) が好ましく、さらに0.05~0.5% (w/v) がより好ましい。当該最終濃度が0.01%未満では疎水性タンパク質のミセル効果が弱く、15%を超えると界面活性剤の析出を招くためいずれも好ましくない。

吸着操作

本発明では水溶性有機溶媒の存在下、核酸を含む試料と固相担体とを接触させることにより、核酸が固相担体の固体相に吸着される。ライシス溶液、固相担体および水溶性有機溶媒の順については限定されない。すなわち、溶解処理に際して固相担体を同時に添加しておいてもよく、溶解処理後に固相単体を添加してもよく、あるいは固相担体と試料とを直接接触させた後にライシス溶液を添加してもよい。ただし、固相担体と試料を先に接触さ

(6)

10

せる場合には、すぐにライシス溶液を添加するのがよい。より好ましくは、溶解処理後に固相担体を添加して試料と接触させるが、この場合、固相担体は水溶性有機溶媒と一緒に加えてもあるいは別個に加えてもよい。

【0031】固相担体はその形状および表面粗さによつて異なるが、ビーズ状の場合、一般に試料5mLにつき1~20個程度使用することができる。核酸の固相担体への吸着に要する時間は、水溶性有機溶媒、核酸含有試料および固相担体を混合後、通常0.5~20分、好ましくは5~15分である。特にゲノムのような長い核酸を抽出する場合、吸着工程時間を長くすることが好ましい。また吸着温度は10~60°C、好ましくは15~40°Cである。

【0032】吸着工程において反応液を攪拌する場合には、通常0.5~20回転/分、好ましくは1~5回転/分の速度である。

・洗浄および溶出工程

固体担体への核酸の吸着工程が終了後、反応液から固相担体を分離して分離した固相担体を洗浄する。洗浄液としては、固体担体に結合した核酸を溶離させないものであれば、吸着工程で使用した水溶性有機溶媒と同じ溶媒であっても、その他の水溶性溶媒であつてもよい。また核酸の固相担体への吸着が維持できるならば必要に応じて水溶性有機溶媒の濃度を低くしてもよい。

【0033】固相担体に吸着した核酸は前記洗浄後、乾燥して次のステップに用いてもよい。乾燥方法は限定されず、減圧乾燥、加熱乾燥、通風乾燥などが用いられる。特に乾燥としては風乾が望ましい。乾燥温度は通常室温ないし60°Cが好ましく、乾燥時間は5~20分間であることが好ましい。こうして得られる核酸が吸着された固相担体は使用目的により、そのまま次の操作、たとえばPCR法による增幅や制限酵素処理など各種の核酸分析に供することができる。あるいは乾燥した固相担体に滅菌蒸留水、トリス塩酸/EDTA緩衝液 (TE) を加えて攪拌することにより固相担体に吸着した核酸を液層に溶出してもよい。

【0034】固相担体から核酸を溶出するには、低イオン強度の溶媒、緩衝液を固相担体に作用させ、必要なら加温する。核酸溶出のための温度は、好ましくは50~90°C、より好ましくは70~80°Cである。このような溶離液としては、水、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液などが例示される。溶出された核酸は、遠心分離、ろ過、デカンテーションなどの操作により担体を除去して回収される。

・核酸分離方法の実施態様

本発明による方法の実施については、特に限定されるものではなく、試料および目的に応じた多様な実施の形態をとることができる。

【0035】本発明の実施において核酸量が少ない場合にはバッチ法の実施が好ましいが、核酸量が多い場合、核酸抽出率を上げるためにカラム方式が好ましい。使用

(7)

II

する固相担体の粒径は実施形態により選ぶことができる。好ましい実施形態の一具体例として、全血を出発試料に用いる例を示すと、

1) 血液1容量を、予め30～85℃に加熱してあり、少なくとも0.01～0.5Mの塩化アンモニウムを含む溶血剤0.1～30倍容量と混合させ、遠心分離で白血球を分離する工程、

2) 白血球を少なくとも0.01～15% (w/v) 界面活性剤、0.05～50mg/ml細胞分解酵素（アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、からなる群から選択される少なくとも一つ以上の酵素を含む）を含むライシス溶液0.01～10倍容量と接触させ、35～85℃で0.1～10時間攪拌、加熱する工程、

3) ストーカス直徑が0.01mm～50mmで、表面に凹凸があり、最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmの固相担体を少なくとも1個以上、アルコール（ブタノール、2-ブタノール、ペンタノール、2-ペンタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノールからなる群から選択される）を少なくとも50% (v/v) 以上含有する溶液、1～10倍容量を前記2) の試料と接触させ、回転攪拌させてから、血液中の核酸を固相担体表面に吸着させる工程からなる方法である。

【0036】本発明による方法は、被験者から極めて容易に採取できる血液試料より核酸を抽出精製するため、核酸に関するデータを臨床分野で利用する目的には特に好ましく適用できる。本発明の方法により、DNAおよびRNAのいずれも分離でき、しかも得られる核酸はさらに精製する必要はなく、そのままPCR法、各種分析に供することができるためである。

【0037】本発明の核酸分離方法は、全手順を单一の反応容器中で実施することも可能であり、これは以下の利点をもたらす。一つは、方法の一段階で、核酸含有試料から遊離した核酸が後続の精製過程において少なくとも固相の大部分に結合するため、汚染の危険を極めて低くすることができる。病原菌への汚染は、ウィルスまたは細菌などの病原菌に感染している可能性のある検体の処理に伴う人体への危険は、サンプルを反応容器に入れる分離段階の第1段階にほぼ限定される。初期の処理においてウィルスまたは細菌は有効に不活性化される。もう一つの汚染として、多数の検体を同時に処理する場合の、相互汚染の問題である。これも単純な工程と操作とあいまって、单一の反応容器で行うことによって、このリスクを回避できる。

【0038】もう一つは、処理の自動化を実現するのに好都合であることである。

自動化

核酸の抽出および調製の自動化は、操作の熟練、高度の知識を必要とせずに、迅速に大量の検体を処理することも可能とする。したがって、核酸調製の自動化は遺伝子工学、遺伝学的診断をはじめとして核酸分析を必要とす

12

る各分野において広範な利用、用途を有するため、極めて重要な意義をもつ。

【0039】本発明の方法は、上述したその特質から、多数のサンプルより機械的に核酸を迅速に分離する目的、すなわち自動処理化にも極めて好適である。本発明の方法が水／フェノールの二相抽出を必要とせず、遠心分離の操作も白血球を分離する段階を除けば、基本的には不要であることから機械化の障害は特にないからである。

10 核酸分離キット

本発明は、白血球含有試料から核酸を単離するための方法のみならず、そのための手段の組み合わせにも係る。その組み合わせの具体的な態様であるキットとして、少なくとも(a)白血球含有試料と接触させる、少なくとも細胞分解酵素および界面活性剤を含むライシス溶液、(b)ストーカス直徑が0.01～50mmであって、最大高さ法で表した場合の表面粗さが0.005～100μmである凹凸を表面に有する水不溶性固相担体、(c)水溶性有機溶媒、(d)該固相担体を洗浄するための洗浄液、および所望により該固相担体に吸着された核酸を回収するための溶離液、とからなることを特徴としている。

【0040】「ライシス溶液」、「水不溶性の固相担体」、「水溶性有機溶媒」については上記に説明したものがいずれも好適に用いられる。「洗浄液」、「溶離液」については、吸着工程で使用した水溶性有機溶媒と同じ溶媒、またはその他の水溶性溶媒、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などを例示することができる。両者は同一系の緩衝液であってもよく、緩衝液の液性を変更する、具体的にはイオン強度、pH、含有する塩類の種類を変化させることにより、洗浄用および溶離の作用を実現させることができる。

【0041】これらのキットを構成する各成分は、別個に用意されてもよく、あるいは、支障がない限り一緒にしてもよい。さらに必要に応じて、本キットは補助剤、専用容器、その他の必要なアクセサリーなどを含んでもよい。

【0042】

【実施例】以下、実施例を挙げて具体的に本発明を説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0043】

【実施例1】ヘパリン入りの全血1mlに70℃に加温した溶血剤、すなわち50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.6) 中に0.15M NH₄Cl、20mM MgCl₂および20mM CaCl₂を含有する溶液、4mlを加えて上下攪拌後、遠心分離 (3000rpm×5分間) して、上清を除去した。

【0044】ペレットにトリプシン (5mg/ml) 、RN Aヌクレアーゼ (2mg/ml) 、リパーゼ (2mg/ml) 、アミラーゼ (1mg/ml) 、0.5% (w/v) ラウリル酸ナトリウムを含む200mM塩化カリウム溶液0.5mlを加え、50℃

(8)

13

で0.5時間加熱した。反応終了後、ストークス直径6mmのポリスチレンボール（表面粗さの最大高さ5μm、Sloan社膜厚計Dektak3030により測定）を1個、イソプロピルアルコール1mlを加えて、試験管を上下3回攪拌して、上澄みを除去した。20mMトリス緩衝液（pH7.6）1mlで2回洗浄後、TE、0.5mlを加えて60°C、30分間攪拌しながら加熱した。続いて上記ポリスチレンボールを試験管から除去し、上澄みを回収した。

【0045】回収された上記上澄み液中に含まれるDNAを吸光度測定により定量した。回収されたDNA量を260nmの紫外吸光度（A260）から算出し、その純度は吸光度の比260nm、280nm、230nm、320nm（A260/A280、A260/A320、A260/A230）および0.8%アガロース電気泳動でゲノムDNAの長さ、バンドの均一性を確認した。回収したDNA、1μgを0.2単位の制限酵素、Hind IIIによる消化、酵素処理後の消化結果を電気泳動で確認した。さらに1fgDNAを鉄型にグロブリン遺伝子の増幅も施し、その結果を電気泳動で確認した。

【0046】

【実施例2】実施例1に使用したポリスチレンボールの代わりに、内部に径2mmの鉄球を含有するガラスボール（直径6mm、表面粗さ10μm）を使用した以外は実施例1と同様な操作を行った。

【0047】

【実施例3】実施例1に使用した酵素トリプシンの代わりに、トリプシンと同濃度のペプチダーゼを使用した以外は実施例1と同様な操作を行った。

【0048】

【実施例4】実施例1に使用した酵素トリプシンの代わ

(8)

14

りに、トリプシンと同濃度のペプチダーゼを使用した以外は実施例1と同様な操作を行った。

【0049】

【実施例5】実施例1に使用したイソプロピルアルコールの代わりに、エタノールを使用した以外は実施例1と同様な操作を行った。

【0050】

【実施例6】EDTA採血管より採取した血液10mlに、40°Cに加熱した0.15M NH₄Cl、60mlを加え、上下攪拌後、3000回転×5分で遠心し、上澄みを除去した。ペレットにペプチダーゼ（5mg/ml）、リパーゼ（2mg/ml）、0.5%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウムを含有する200mMKC1溶液0.5mlを加え、50°Cで1.5時間加熱した。反応終了後、ストークス直径10mmのポリプロピレンボール（表面粗さの最大高さ10μm）を2個、1mlエタノールを加え、試験管を上下3回攪拌後、上澄みを除去した。20mMトリス緩衝液（pH7.6）1mlで2回洗浄後、0.5mlのTEを加え、70°Cで30分攪拌しながら加熱した。続いて、ポリプロピレンボールを試験管から除去し、上澄みを回収した。

【0051】

【比較例1】参照実験として実施例1で得た白血球沈殿をフェノール・クロロホルム法で抽出した。抽出法は、「分子クローニング」（J. Sambrook、1982、CSH出版）に従った。実施例及び比較例の結果を、下記の表1に示す。

【0052】

【表1】

DNA回収法	DNA回収量(μg)	A260/A280	A260/A230	回収DNA電気泳動	0.2U Hind III消化	グロブリンPCR増幅
実施例1	45	1.99	2.01	200Kに単バンド	元バンドが消え、スメアとなり、DNA完全消化	増幅できた
実施例2	46	2.05	1.96	同上	同上	同上
実施例3	44	2.03	1.89	同上	同上	同上
実施例4	45	2.13	2.01	同上	同上	同上
実施例5	42	1.97	2.00	同上	同上	同上
実施例6	412	1.95	1.92	同上	同上	同上
比較例1	8.9	1.77	1.67	同上	元バンドが僅かに残る	同上

【0053】

【発明の効果】本発明の核酸抽出方法及びその試薬を用いることにより、血液から短時間、簡便、低コストで核酸を高純度、大量に精製することができる。かつ、有毒溶媒、腐食性溶媒を使用せず、作業環境、作業者にとつ

ても優しい方法の確立により、遺伝子工学、遺伝子診断、遺伝子治療、ゲノム化学、ゲノム創薬等の分野に広く応用ができる。また処理の自動化も可能な方法である。

フロントページの続き

(72)発明者 日方 幹雄
東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ
エスアール株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA03
4B064 AF23 CA21 CC03 CD21 CE09
DA01 DA16